



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 854**

51 Int. Cl.:
C07K 14/775 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02290065 .8**
96 Fecha de presentación : **11.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1223177**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.07.2002**

54 Título: **Procedimiento de producción de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo y medio de conservación que incorpora dichas lipoproteínas.**

30 Prioridad: **11.01.2001 FR 01 00292**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.07.2009

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA
RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)
147, rue de l'Université
75338 Paris Cédex 07, FR
Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes**

72 Inventor/es: **Anton, Marc;
Martinet, Virginie;
Tainturier, Daniel y
Moussa, Mohamed**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de producción de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo y medio de conservación que incorpora dichas lipoproteínas.

La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad (LDL - Low Density Lipoprotein) de yema de huevo, a un medio de conservación de células vivas que contiene dichas lipoproteínas, así como al uso de estas lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo como agente crioprotector.

El desarrollo de tecnologías tales como la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la procreación asistida, ha estado facilitado por la posibilidad de congelar unas células vivas, tales como unas células reproductoras de tipo espermatozoides o unas células embrionarias, en unas condiciones que permiten que dichas células vuelvan a tener sus funcionalidades después de la descongelación.

Sin embargo, para mejorar las prestaciones de estos métodos, se han perfeccionado las técnicas de congelación con vistas a reducir el efecto del choque térmico sobre las células. Así, todos los diluyentes de congelación del semen incorporan en la actualidad yema de huevo como agente crioprotector. Este crioprotector desempeña una función determinante en la protección de los espermatozoides contra el choque térmico y permite obtener un mayor número de espermatozoides vivos después de la descongelación y mejorar su poder fecundante. En cambio, la yema de huevo es un buen medio de cultivo para todos los microorganismos, lo que aumenta el riesgo de contaminación bacteriana.

Por lo tanto, se han empezado unos estudios estos últimos años con vistas a sustituir la yema de huevo contenida en particular en los medios de conservación de semen por otro agente crioprotector cuya naturaleza es susceptible de limitar las contaminaciones microbiológicas. Sin embargo, puesto que el mecanismo de acción de la yema de huevo, como agente crioprotector, no se ha elucidado en la actualidad a pesar de que se han emitido un cierto número de hipótesis, estos estudios resultan difíciles.

Paralelamente, se han llevado a cabo unos ensayos con vistas a aislar ciertos constituyentes de la yema de huevo, en particular las lipoproteínas de baja densidad del plasma de la yema de huevo de la cual forman el constituyente principal. Sin embargo, todos los procedimientos descritos en la actualidad en la técnica son unos procedimientos aplicables únicamente en laboratorio y no permiten una producción industrial de dichos procedimientos. Algunos métodos han sido desarrollados en particular sobre la base de técnicas de ultra-centrifugación que necesitan, para el aislamiento de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, entre treinta y cuarenta horas de centrifugación con una ultra-centrifugadora que constituye un material caro no aplicable a una producción industrial.

Dicho ejemplo del uso de las técnicas de centrifugación se describe en la patente US-A-5.063.077. La patente DD 273.164 describe el uso de técnicas de ultrafiltración.

Otros métodos desarrollados usan unos procedimientos cromatográficos nuevamente no aplicables a escala industrial. Paralelamente, el artículo de OLLERO M *et al.*: "Loss of plasma membrane proteins of bull spermatozoa through the freezing-thawing process" THERIOGENOLOGY, vol. 49, nº 3, 1998, páginas 547-555 ilustra una técnica de separación mediante electroforesis de las proteínas incorporadas a la membrana de los espermatozoides con fines de análisis para identificar la función de las lipoproteínas como agente crioprotector. Sin embargo, este documento no describe la separación de dicha fracción de lipoproteínas.

El artículo de Demianowicz y Strzezek: "The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state" Reproduction on domestic animals, vol. 31, nº 1, 1996, páginas 279-280, describe el uso de LDL de yema de huevo como agente crioprotector para la obtención de un medio de conservación de las células vivas.

El objetivo de la presente invención es por lo tanto proponer un procedimiento de obtención de fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo a partir de plasma de yema de huevo, comprendiendo este procedimiento unas etapas susceptibles de ser realizadas de manera industrial para permitir una producción en masa de dichas lipoproteínas.

Otro objetivo de la presente invención es proponer un medio para la conservación, en el estado refrigerado o congelado, de células vivas, permitiendo la composición de este medio aumentar de manera significativa el porcentaje de supervivencia y eventualmente la movilidad de las células tras la descongelación.

Con este fin, la invención tiene por objeto un procedimiento de producción de fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo a partir de plasma de yema de huevo, caracterizado porque comprende por lo menos las etapas que consisten:

- en añadir por lo menos una sal de amonio a plasma de yema de huevo con vistas a obtener, después de la eliminación del precipitado formado, una fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, y

- en dializar la fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo contra una disolución acuosa, preferentemente salina, con el fin de provocar, durante la eliminación de los iones amonio, una precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo, con vistas a la obtención de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo.

5

El procedimiento descrito anteriormente, que se basa en una separación de las diferentes partes de la yema de huevo mediante adición y después eliminación de por lo menos una sal seguida respectivamente de centrifugaciones suaves, es un procedimiento fácilmente extrapolable a la escala industrial. La etapa clave de este procedimiento reside en la etapa de diálisis durante la cual los inventores han observado que, de manera sorprendente, el uso de un medio de diálisis constituido esencialmente por agua permitía obtener una precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja densidad del plasma enriquecido en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo. Esta precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja densidad durante la eliminación de los iones amonio no se había observado nunca hasta ahora.

10

15

La invención tiene asimismo por objeto un medio para la conservación, en el estado refrigerado o congelado, de células vivas, tales como semen o un embrión, estando el medio constituido por un medio de base formado por constituyentes, tales como un agente de nutrición y un antibiótico, que convienen para la conservación de dichas células, caracterizado porque comprende además, como agente crioprotector de las células, una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de yema de huevo para limitar, de manera significativa, el efecto del choque térmico sobre las características funcionales de dichas células, presentando esta fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de yema de huevo para limitar, de manera significativa, el efecto del choque térmico sobre las características funcionales de dichas células, obtenida según el procedimiento descrito anteriormente, un porcentaje de pureza por lo menos igual a 97%.

20

25

Unos estudios efectuados a partir de este medio han demostrado, de manera inesperada, que las lipoproteínas de baja densidad poseen un efecto crioprotector superior a las lipoproteínas incluidas en la yema de huevo completo, en particular sobre un semen de toro refrigerado o congelado. Este efecto superior se aprecia mediante la medición del porcentaje de supervivencia y de la movilidad de los espermatozoides después del choque térmico.

30

La invención tiene asimismo por objeto el uso de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo que presenta un porcentaje de pureza por lo menos igual a 97% como agente crioprotector para la obtención de un medio de conservación de células vivas en el estado refrigerado o congelado.

35

La invención tiene asimismo por objeto el uso de un medio de conservación del tipo citado anteriormente para la conservación en el estado refrigerado o congelado de espermatozoides de vertebrados con vistas a la inseminación artificial.

La invención se pondrá más claramente de manifiesto a partir de la lectura de la siguiente descripción de ejemplos de realización, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

40

la figura 1 representa de manera esquemática las diferentes etapas del procedimiento de obtención de la fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo;

la figura 2 representa un histograma que muestra el efecto de las diferentes concentraciones de LDL de la yema de huevo de gallina sobre la movilidad de los espermatozoides de toro tras la conservación a +4°C durante 24 horas; y

45

la figura 3 representa el efecto de diferentes concentraciones de LDL de la yema de huevo de gallina sobre la movilidad de los espermatozoides de toro tras la congelación y la descongelación.

50

Tal como se ha mencionado anteriormente, los únicos métodos que existen en la actualidad para purificar las lipoproteínas de baja densidad (LDL) de yema de huevo son unos métodos de laboratorio que presentan un bajo rendimiento y usan unos procedimientos no extrapolables a la escala industrial. Estos métodos se basan en particular en unas etapas de ultracentrifugación y de cromatografía de exclusión estérica.

55

Las lipoproteínas de baja densidad (LDL) forman el constituyente principal del plasma de yema de huevo. Estas lipoproteínas están organizadas en esferas de 17 nm a 60 nm de diámetro, estando estas esferas a su vez constituidas por un núcleo de lípidos neutros (triglicéridos y éster de colesterol) rodeado por una película de fosfolípidos y de proteínas en contacto con la fase acuosa. Estas LDL, que son los constituyentes principales de la yema de huevo, contienen entre 83 y 89% de lípidos y entre 11 y 17% de proteínas. Tienen un peso molecular comprendido entre 1.10^6 Da y 3.10^6 Da. Los lípidos se reparten por su parte en 74% de lípidos neutros (triglicéridos y colesterol) y en 26% de fosfolípidos. Se sabe desde hace mucho tiempo que las lipoproteínas de baja densidad están contenidas en el plasma de yema de huevo.

60

La primera etapa de cualquier procedimiento de producción de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo consiste por lo tanto en separar, en la yema de huevo, el plasma de los gránulos.

65

Evidentemente, antes de la separación del plasma de los gránulos, conviene en primer lugar extraer la yema de huevo del huevo. Para ello, se procede a cascar los huevos, procediendo estos huevos generalmente de gallinas criadas en un criadero de granja. Estos huevos se deben cascar como máximo 24 horas después de su puesta. La yema se separa

de la clara. Cada yema se hace rodar delicadamente sobre un papel filtro para eliminar el albumen y las chalazas que lo unen a la membrana vitelina. La membrana se corta a continuación mediante una hoja de escalpelo y la yema se vierte en una probeta mantenida en hielo machacado para evitar la desnaturalización de las proteínas. La yema presenta un contenido en materias secas de aproximadamente 52,5%. Evidentemente, esta etapa de cascar los huevos y de separación de la yema de la clara de huevo se podrá modificar para su realización a escala industrial.

Para permitir a continuación la separación del plasma y de los gránulos, la yema pura se diluye en una disolución de cloruro de sodio (NaCl 0,17 M en una relación de 1:1 peso:peso) y después se somete a una agitación moderada a 4°C durante 1 hora en un agitador magnético que permite equilibrar la disolución. Esta dilución se centrifuga después a 10.000 g durante 45 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante líquido que constituye el plasma se recoge y se centrifuga en las mismas condiciones. El plasma purificado se recupera y se conserva a 4°C. Se elimina el poso de centrifugación constituido por los gránulos. Esta etapa de separación del plasma de los gránulos es una etapa habitual bien conocida en la técnica.

La segunda etapa consiste en obtener una fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad, eliminando en particular del plasma las livetinas contenidas en este plasma. Para ello, se añade por lo menos una sal de amonio al plasma de yema de huevo con vistas a obtener, después de la eliminación del precipitado formado, una fracción enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo. La adición de sal de amonio se efectúa en frío manteniendo el pH constante cerca de 8,7. La sal de amonio usada es preferentemente sulfato de amonio por lo menos al 30% de saturación. En el procedimiento ilustrado en la figura 1, el sulfato de amonio usado es sulfato de amonio al 40% de saturación, es decir, 20,5 g de sulfato de amonio para 100 ml de plasma. El sulfato de amonio debe ser añadido muy lentamente a fin de evitar la desnaturalización de las proteínas. Se necesita a continuación una agitación de una hora para equilibrar la disolución. Esta agitación se efectúa a 4°C. Después, la mezcla se centrifuga a 10.000 g durante 45 minutos, lo que permite obtener un poso y un sobrenadante. El sobrenadante corresponde a la fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de la yema de huevo mientras que el poso corresponde a la fracción de plasma enriquecida en livetinas. Este poso de centrifugación se eliminará, mientras que el sobrenadante se someterá a continuación a una etapa de diálisis.

La diálisis se efectúa durante diez horas aproximadamente. El baño de diálisis está constituido por agua destilada que contiene entre 0 y 50 mM de NaCl. Este baño de diálisis se cambia cada dos horas y se asegura una agitación constante. Así, en el ejemplo representado en la figura 1, se dializan 200 ml de sobrenadante contra 7,5 l de agua salada durante 10 horas con cinco cambios de baño de diálisis. Se aumenta la concentración de NaCl en cada cambio de baño de diálisis para evitar una destrucción de las micelas de las lipoproteínas. La membrana usada es una membrana MCL 8x100 CLR. La membrana se hierve al baño maría durante 15 minutos previamente a la diálisis. Durante la diálisis, la eliminación de los iones amonio provoca una precipitación selectiva de un poso rico en lipoproteínas de baja densidad. Después de la diálisis, la mezcla se centrifuga a 10.000 g durante 45 minutos y se obtiene un poso de lipoproteínas de baja densidad puro al 97% y se conserva a 4°C.

El procedimiento descrito anteriormente permite así obtener en 24 horas aproximadamente 9 g de poso a partir de 16 ml de yema de huevo. Tal como se ha mencionado anteriormente, este poso presenta unas características muy parecidas a las de las lipoproteínas de baja densidad puras con un grado de pureza por lo menos igual a 97% y parecida en realidad un 97,3% que permite prever una producción industrial. Por otro lado, el rendimiento de dicho procedimiento es particularmente bueno, por lo menos igual a 60%.

A partir de estas fracciones purificadas de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo obtenidas, se han realizado unos ensayos con vistas a demostrar que el uso de estas fracciones en unos medios útiles para la conservación, en el estado refrigerado o congelado, de células vivas permitía obtener unos resultados inesperados.

Así, los ensayos han demostrado que un medio que comprende además de un medio de base habitual formado por constituyentes, tales como un agente de nutrición y un antibiótico, que convienen para la conservación de las células vivas, una fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo como agente crioprotector de las células en sustitución de la yema de huevo, permitía obtener un aumento significativo de la duración de vida y de la movilidad de las células en particular cuando estas células están constituidas por unos espermatozoides.

Se ha demostrado que esta actividad del medio de conservación se obtenía más particularmente cuando la fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo está presente en el medio de conservación a una concentración P/V (peso/volumen) comprendida en el intervalo [2,5% - 15%] y preferentemente en el intervalo [5% - 10%].

El ejemplo descrito a continuación se aplica a un medio de conservación en el que el medio de base es un diluyente de congelación constituido en particular por lo menos por un antibiótico, por un agente de nutrición y por un tampón, siendo este medio de base conveniente para la dilución de espermatozoides de una especie animal determinada.

El medio de base está constituido por el medio Triladyl usado habitualmente como diluyente de congelación. La composición de este medio de base es tal como sigue: 100 ml de este medio Triladyl contiene 2,42 g de Tris, 1,48 g de ácido cítrico, 1,00 g de fructosa, 6,4 ml de glicerol. La concentración por ml de antibiótico es de 250 µg de gentamicina y de 150 µg de penicilina.

ES 2 323 854 T3

A partir de este medio de base, se han preparado siete medios de conservación tal como se ilustra en la tabla siguiente.

Medio de control	LDL1 2,5%	LDL2 5%	LDL3 10%	LDL4 15%	LDL5 20%	Medio Biociphos
Medio de base	Medio de base	Medio de base	Medio de base	Medio de base	Medio de base	Composición desconocida
Yema de huevo 20 ml	LDL 2,5%	LDL 5%	LDL 10%	LDL 15%	LDL 20%	

En esta tabla, se usan como medios de control el medio Triladyl que contiene 20 ml de yema de huevo y el medio Biociphos comercializado por la compañía Instruments de Médecine Vétérinaire 61302, L'Aigle, Francia. Se debe observar que la composición del medio Biociphos es desconocida. El único dato relativo a este medio se refiere al uso de agente crioprotector a base de lecitina de soja. Paralelamente a estos dos medios de control, se preparan cinco medios LDL1 a LDL5. Cada medio está constituido por el medio de base (Triladyl) y por una fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo a unas concentraciones (P/V) comprendidas entre 2,5 y 20%. Evidentemente, esta fracción de lipoproteínas de baja densidad se obtiene preferentemente de acuerdo con el procedimiento citado anteriormente.

A partir de estos medios, se han llevado a cabo dos experimentos de manera que se demuestra la influencia de la fracción LDL de la yema de huevo a diferentes concentraciones durante la conservación de espermatozoides de toro en el estado refrigerado y en el estado congelado.

Experimento nº 1: Dos eyaculaciones recogidas se diluyen en los medios de conservación preparados anteriormente. Se procede de la siguiente manera. Se disponen siete tubos de ensayo al baño maría a 34°C, cada tubo recibe 0,5 ml de uno de los medios citados anteriormente y 0,5 ml de esperma para obtener un volumen final de 1 ml. Los tubos se dejan durante 10 minutos a 34°C. Durante este tiempo, la concentración en espermatozoides se calcula de manera que se diluye de nuevo la mezcla para obtener una concentración final de 120.10⁶ espermatozoides por ml.

Un ml de cada tubo que contiene 120.10⁶ espermatozoides por ml se dispone entonces en un criotubo y se conserva durante 24 horas a +4°C antes de ser analizado. El sistema de análisis elegido es el sistema ATS 20 (J.C. Diffusion Internationale, La Ferté Fresnet, Francia).

Los resultados se proporcionan en la figura 2 en la que se representa en abscisas cada medio de conservación citado anteriormente y en las ordenadas la movilidad de los espermatozoides en dicho medio. Estos resultados demuestran claramente el efecto beneficioso de la fracción LDL de la yema de huevo sobre la movilidad de las células a una concentración P/V comprendida en el intervalo (5% - 10%).

Experimento nº 2: Después de este descenso de temperatura en una hora y media a +4°C, se preparan cinco escamas de 0,5 ml a partir de cada uno de los siete tubos. Los siete lotes de cinco escamas se mantienen a +4°C para el equilibrio durante dos horas y después se congelan. La congelación se realiza en los vapores de nitrógeno líquido bajando progresivamente la rampa que soporta las escamas hacia el nitrógeno líquido. La sonda de un termopar dispuesta en la rampa permite controlar la curva de enfriamiento. Cuando la temperatura alcanza -150°C, las escamas se sumergen en el nitrógeno líquido a -196°C. El almacenamiento se efectúa en cuba, en el nitrógeno líquido, a -196°C.

Para permitir la descongelación de las escamas así congeladas, se sumergen tres escamas de cada concentración de la fracción LDL de la yema de huevo durante 45 segundos al baño maría a 37°C. Al final de esta descongelación, se seca cada escama, se seccionan sus extremos con unas tijeras y después se vacían en un criotubo dispuesto al baño maría calentado a 37°C. Después de 10 minutos a 37°C, el semen se analiza con la ayuda del sistema ATS 20.

Los resultados sobre la movilidad de los espermatozoides de toro tras la congelación y la descongelación se ilustran en la figura 3, en la que se representa en las abscisas cada medio de conservación citado anteriormente y en las ordenadas la movilidad de los espermatozoides en dicho medio.

Se observa así que la movilidad de los espermatozoides aumenta a partir de una concentración de 2,5% de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo en el medio de base y alcanza un máximo entre 5 y 10% de lipoproteínas de baja densidad, y después empieza a disminuir a partir de 15% de lipoproteínas de baja densidad con relación al control independientemente de las condiciones de enfriamiento.

ES 2 323 854 T3

Estos resultados demuestran claramente que la fracción de lipoproteínas de baja densidad posee un efecto beneficioso sobre la movilidad y las características de los movimientos de los espermatozoides refrigerados a +4°C o congelados con relación a la yema de huevo no tratada contenida en el control. Estos resultados pueden parecer asombrosos sabiendo que la yema de huevo contiene el equivalente a 6,6% de lipoproteínas de baja densidad.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo a partir de plasma de yema de huevo, **caracterizado** porque comprende por lo menos las etapas que consisten:

- en añadir por lo menos una sal de amonio a plasma de yema de huevo con vistas a obtener, después de la eliminación del precipitado formado, una fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, y
- en dializar la fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo contra una disolución acuosa, preferentemente salina, con el fin de provocar, durante la eliminación de los iones amonio, una precipitación selectiva de las lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, con vistas a la obtención de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se efectúa la adición de la sal de amonio, constituida por sulfato de amonio por lo menos al 30% de saturación, en frío manteniendo el pH constante próximo a 8,7, porque se equilibra bajo agitación la disolución formada, y porque se centrifuga dicha disolución para permitir fraccionar el plasma de yema de huevo en un poso y en un sobrenadante, siendo el sobrenadante, que corresponde a la fracción de plasma enriquecida en lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, sometido ulteriormente a una etapa de diálisis.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque se efectúa la diálisis durante diez horas aproximadamente, estando el baño de diálisis constituido por agua que contiene entre 0 y 50 mM de NaCl cambiado aproximadamente cada dos horas, y porque se somete, después de la diálisis, la mezcla a una centrifugación suave para obtener un poso de centrifugación constituido por lipoproteínas de baja densidad puro por lo menos al 97%.

4. Medio para la conservación en el estado refrigerado o congelado de células vivas tales como semen o un embrión, estando el medio constituido por un medio de base formado por constituyentes, tales como un agente de nutrición y un antibiótico, que convienen para la conservación de dichas células, **caracterizado** porque comprende además, como agente crioprotector de las células, una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad (LDL) de yema de huevo para limitar, de manera significativa, el efecto del choque térmico sobre las características funcionales de dichas células, presentando esta fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo, obtenida de acuerdo con el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, un porcentaje de pureza por lo menos igual a 97%.

5. Medio de conservación según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo está presente en el medio a una concentración P/V comprendida en el intervalo [2,5% - 15%] y preferentemente en el intervalo [5% - 10%].

6. Medio de conservación según una de las reivindicaciones 4 y 5, **caracterizado** porque el medio de base es un diluyente de congelación que conviene para la dilución de esperma de una especie animal determinada, conteniendo además este diluyente constituido por lo menos por un antibiótico, por un agente de nutrición y por un tampón, como agente crioprotector, una fracción de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo.

7. Medio de conservación según una de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado** porque la yema de huevo es una yema de huevo de gallina.

8. Uso de una fracción purificada de lipoproteínas de baja densidad de yema de huevo obtenida de acuerdo con el procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, que presenta un porcentaje de pureza por lo menos igual a 97% como agente crioprotector para la obtención de un medio de conservación de células vivas en el estado refrigerado o congelado.

9. Uso de un medio de conservación según una de las reivindicaciones 4 a 7, para la conservación en el estado refrigerado o congelado de esperma de vertebrados con vistas a la inseminación artificial.

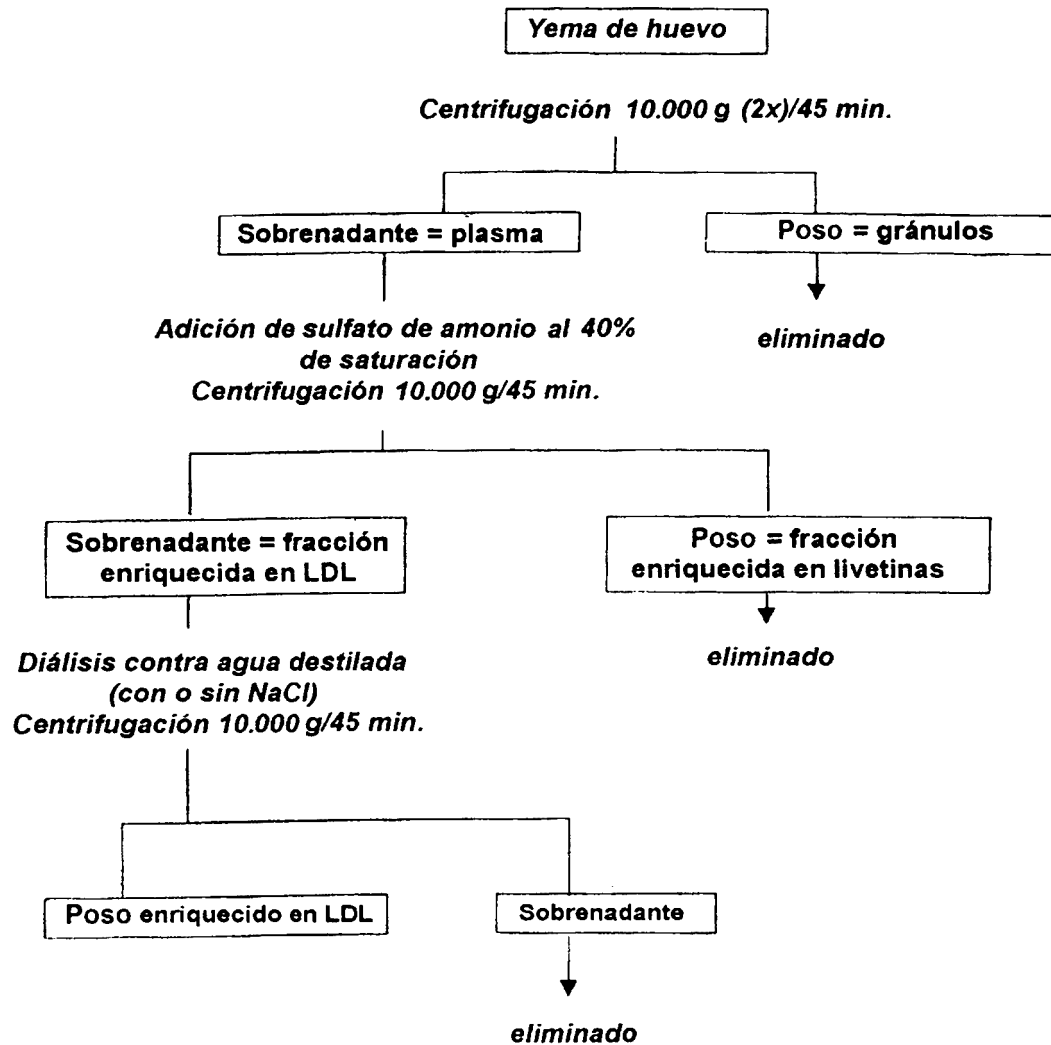


Figura 1

Figura 2

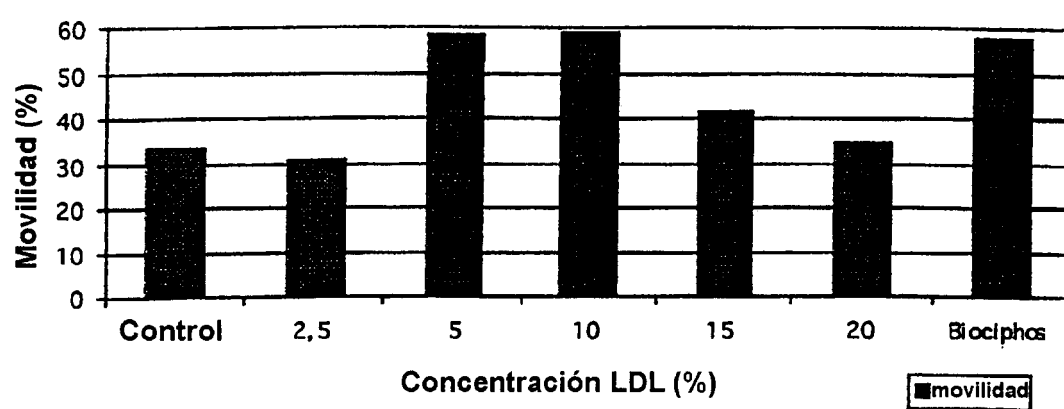


Figura 3

